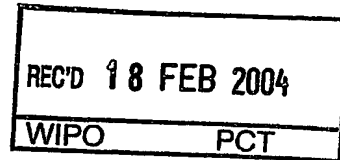


KONINKRIJK DER



NEDERLANDEN

Bureau voor de Industriële Eigendom



Hierbij wordt verklaard, dat in Nederland op 20 januari 2003 onder nummer 1022443,  
ten name van:

**NEDERLANDSE ORGANISATIE VOOR TOEGEPAST-  
NATUURWETENSCHAPPELIJK ONDERZOEK TNO**  
te Delft

een aanvraag om octrooi werd ingediend voor:

"Sphingolipiden voor verbetering van de samenstelling van de darmflora",

en dat de hieraan gehechte stukken overeenstemmen met de oorspronkelijk ingediende stukken.

Rijswijk, 12 februari 2004

De Directeur van het Bureau voor de Industriële Eigendom,  
voor deze,

Mw. M.M. Enhus

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1022443

B. v.d. I.E.

20 JAN. 2003

## UITTREKSEL

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het verbeteren van de samenstelling van de darmflora, op een voedingsmiddel omvattende een sphingolipide voor toepassing in een dergelijke werkwijze, op werkwijzen voor de bereiding van een dergelijk voedingsmiddel en op de toepassing van sphingolipiden voor de bereiding van een geneesmiddel voor het verbeteren van de samenstelling van de darmflora. Meer in het bijzonder ziet de onderhavige uitvinding op een werkwijze en voedingsmiddel waarin een sphingolipide gekozen uit de groep bestaande uit fytosphingosine, sphingosine, lyso-sphingomyeline en sphinganine, of een precursor, een derivaat of een geschikt zout daarvan wordt toegepast.

contacttijd in min	Blank	Sphinganine 2.5 µg/ml	Sphinganine 10 µg/ml	Sphinganine 50 µg/ml	Phytosphing 2.5 µg/ml	Phytosphing 10 µg/ml	Phytosphing 50 µg/ml
0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
~50	5.0	3.0	2.7	3.0	2.7	3.0	2.7
~180	5.0	3.0	2.7	3.0	2.7	3.0	2.7
400	5.0	2.7	2.7	3.0	2.7	3.0	2.7

log t.o.t.a.l.k.l.e.m.g.e.t.a.l. (k.v.e./ml)

contacttijd in min

Legend:

- Blank
- Sphinganine 2.5 µg/ml
- Sphinganine 10 µg/ml
- Sphinganine 50 µg/ml
- Phytosphing 2.5 µg/ml
- Phytosphing 10 µg/ml
- Phytosphing 50 µg/ml

contacttijd in min	Blank	Sphinganine 2.5 µg/ml	Sphinganine 10 µg/ml	Sphinganine 50 µg/ml	Phytosphing 2.5 µg/ml	Phytosphing 10 µg/ml	Phytosphing 50 µg/ml
0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
50	5.0	4.8	3.7	2.7	5.0	3.7	2.7
180	5.0	4.8	3.4	2.7	5.0	2.7	2.7
360	5.0	4.1	2.7	2.7	5.0	2.7	2.7

contacttijd in min	Blank	Sphinganine 2.5 µg/ml	Sphinganine 10 µg/ml	Sphinganine 50 µg/ml	Phytosphing 2.5 µg/ml	Phytosphing 10 µg/ml	Phytosphing 50 µg/ml
0	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7
~60	3.3	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9
~180	3.6	3.6	3.4	3.2	3.4	3.2	3.2
~360	3.3	3.1	2.9	2.8	3.0	2.9	2.8

log totaal kiemgetal (k.u.e./ml)

contacttijd in min

Legend:

- Blank
- Sphingarine 2.5 µg/ml
- Sphingarine 10 µg/ml
- Sphingarine 50 µg/ml
- Phytosphing 2.5 µg/ml
- Phytosphing 10 µg/ml
- Phytosphing 50 µg/ml

P62431NL00

Titel: Sphingolipiden voor verbetering van de samenstelling van de darmflora.

## GEBIED VAN DE UITVINDING

De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het verbeteren van de samenstelling van de darmflora, op de toepassing van sphingolipiden voor het verbeteren van de samenstelling van de darmflora, op een farmaceutisch preparaat en een voedingsmiddel omvattende een sphingolipide voor het verbeteren van de samenstelling van de darmflora en op werkwijzen voor de bereiding daarvan.

## ACHTERGROND VAN DE UITVINDING

Mens en dier worden regelmatig ziek door microbiële infecties of door een verstoring van hun darmflora door een, meestal lichaamsvreemd, micro-organisme. Bij de behandeling van dergelijke infecties worden veelal antibiotica toegepast om de ongewenste pathogene organismen te verwijderen.

Een nadeel van het gebruik van antibiotica is dat niet alleen de pathogene micro-organismen, maar ook de nuttige en essentiële micro-organismen in de darmflora door de antibiotica worden gedood. De patiënt ondervindt hiervan grote hinder, waaronder het optreden van diarree, en een periode van herstel van de darmverstoring is noodzakelijk. Er zijn slechts weinig antibiotica die een dusdanige selectieve werking tegen ongewenste micro-organismen hebben, dat daardoor het optreden van darmverstoringen bij antibioticumgebruik kan worden voorkomen.

Een ander nadeel van het gebruik van antibiotica is dat bepaalde individuen allergische reacties vertonen tegen bepaalde antibiotica, zoals penicilline. Dit heeft als consequentie dat die personen bij voorkeur niet met een dergelijk antibioticum behandeld worden en dat zij contact met een dergelijk antibioticum zo veel mogelijk moeten vermijden.

Antibiotica worden op dit moment nog veel in diervoeder toegepast om het metabolisme van de darmflora te verminderen en de beschikbaarheid van voedingsstoffen voor de gastheer te verbeteren. Op deze wijze kan de vleesopbrengst worden verhoogd. Tevens worden

5 antibiotica toegepast om infecties te bestrijden. Echter, vlees van vee dat met antibioticum is behandeld, wordt om uiteenlopende redenen niet geschikt geacht voor menselijke consumptie. Ook de melk van melkvee dat met antibioticum is behandeld is voor menselijke consumptie ongeschikt. Het gebruik van antibiotica in veevoeder staat dan ook ter discussie en er

10 zijn nog nauwelijks alternatieven.

#### SAMENVATTING VAN DE UITVINDING

Verrassenderwijs is nu gevonden dat een aantal typen sphingolipiden selectief in de darm bepaalde ongewenste bacteriën kunnen

15 afdoden terwijl andere bacteriesoorten nagenoeg ongemoeid worden gelaten. Zo wordt bijvoorbeeld *Clostridium difficile*, een veel voorkomende pathogene bacterie die diarree veroorzaakt en moeilijk te bestrijden is met antibiotica, door bepaalde sphingolipiden zeer effectief afgedood terwijl belangrijke en nuttige bacteriën in de darmflora ongemoeid worden gelaten.

20 De sphingolipiden die deze werking hebben kunnen daarom zeer geschikt worden toegepast in een werkwijze voor de verbetering van de samenstelling van de darmflora doordat bepaalde, ongewenste bacteriën middels de werkwijze kunnen worden afgedood, terwijl andere, voor het functioneren van de darmflora belangrijke bacteriesoorten nagenoeg

25 ongemoeid kunnen worden gelaten of middels de werkwijze veel minder in hun groei worden geremd.

De onderhavige uitvinding heeft daarom in een eerste aspect betrekking op een werkwijze voor het verbeteren van de samenstelling van de darmflora van een vogel of een zoogdier, waaronder een mens,

30 omvattende het toedienen aan genoemde vogel of zoogdier van een

voedingsmiddel waarin één of meer sphingolipiden gekozen uit de groep bestaande uit fytosphingosine, sphingosine, lyso-sphingomyeline en sphinganine of een precursor, een derivaat, of geschikt zout daarvan, overaanwezig zijn.

5                In een tweede aspect heeft de onderhavige uitvinding betrekking op een voedingsmiddel, waarin één of meer sphingolipiden gekozen uit de groep bestaande uit fytosphingosine, sphingosine, lyso-sphingomyeline en sphinganine of een precursor, een derivaat, of geschikt zout daarvan, overaanwezig zijn.

10              Een dergelijk voedingsmiddel kan zeer geschikt een diervoeder zijn en vormt daarmee een belangrijk alternatief voor antibiotica om de groei van bijvoorbeeld fokvee te verbeteren. Sphingolipiden vormen op basis van deze uitvinding daarom een alternatief voor het gebruik van antibiotica in veevoeder. In een voorkeursuitvoeringsvorm omvat een dergelijke  
15 voedingsmiddel het sphingolipide fytosphingosine.

Andere aspecten van de onderhavige uitvinding zullen duidelijk worden in de onderstaande beschrijving.

## BESCHRIJVING VAN DE FIGUREN

20              Figuur 1 toont de concentratie- en tijdsafhankelijke antimicrobiële werking van sphinganine en fytosphingosine op *Lactobacillus acidophilus* met (A) en zonder (B) gal en op *Clostridium difficile* met (C) en zonder (D) gal zoals beschreven in Voorbeeld 1.

25              Figuur 2 toont de sphingolipidenconcentraties in de darminhoud van een gefisteld varken verzameld aan het einde van de dunne darm als functie van de tijd na het voederen van het varken met varkensbasisvoer dat 1 gew.% fytosphingosine bevatte zoals beschreven in Voorbeeld 4.

Figuur 3 toont de kiemgetallen van de verschillende anaërobe bacteriën na incubatie van het bacteriemengsel in het TIM-2 dikke darm

model in aanwezigheid van 50 µg/mL fytosphingosine zoals beschreven in Voorbeeld 5.

## GEDETAILEERDE BESCHRIJVING VAN DE UITVINDING

5           Sphingolipiden zijn lipiden die in lage concentraties in voeding voorkomen en zij vormen een klein maar belangrijk bestanddeel van de cellen van planten, dieren en mensen. Omdat sphingolipiden lichaamseigen stoffen zijn van mens en dier zijn, is een voordeel van het gebruik van sphingolipiden bij mensen dat individuen met een antibioticumallergie of  
10 een 'chemofobie' een belangrijk alternatief kan worden geboden voor de bestaande (chemische) antibiotica.

Sphingolipiden zijn in het algemeen opgebouwd uit een lange sphingoïde base (sphingosine, sphinganine, 4-hydroxysphinganine, of een gerelateerde verbinding) als de centrale groep van het molecuul of  
15 "backbone" (zie o.a. Karlsson. 1970. Chem. Phys. Lipids, 5:6-43), die gebruikelijk gemodificeerd is met een amide-gekoppelde lange-keten vetzuur en een kopgroep. Er zijn circa 300 klassen van sphingolipiden bekend met verschillende kopgroepen (cholinefosfaat, glucose, galactose, polysacchariden) en met verschillende vetzuren en sphingoïde basen (zie o.a.  
20 Merrill & Sweeley. 1996. New Comprehensive Biochemistry: Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes, (Vance, D.E. & Vance, J.E., eds.), pp. 309-338, Elsevier Science, Amsterdam).

De eenvoudigste sphingolipiden zoals sphingosine en sphinganine komen normaal slechts in zeer lage concentraties in voeding voor. De rijkste  
25 sphingolipidebronnen zijn melkproducten, eieren en sojabonen. De belangrijkste sphingolipiden in onze voeding zijn sphingomyeline (melk en eieren) en ceramide (vlees). Vette melk bevat vooral sphingomyeline, maar bevat ook glucosylceramide en lactosylceramide. Aardappel, appel, tomaat, spinazie, paprika en rijst bevatten vooral cerebrosides in lage concentraties.

Voor zover bekend vormen sphingolipiden een niet-essentieel bestanddeel van ons voedsel; het lichaam van mens en dier is in staat sphingolipiden te synthetiseren. De sphingolipiden die met het voedsel in het maagdarmkanaal aankomen worden gedeeltelijk door de darmflora zelf en gedeeltelijk door in het maagdarmkanaal aanwezige hydrolytische 5 enzymen, zoals alkalische en neutrale sphingomyelinasen en ceramidasen, gehydrolyseerd tot, onder andere, sphingosine en ceramides. Er zijn aanwijzingen dat de hydrolyseproducten ceramide en sphingosine een sleutelrol vervullen bij celgroei, celdifferentiatie, apoptose en andere 10 belangrijke fysiologische processen. Ondanks de aanwezigheid van deze hydrolytische systemen wordt bij ratten nog circa 25% van het gevoerde sphingomyeline in de ontlasting teruggevonden (zie o.a. Nilsson. 1968. Biochim. Biophys. Acta. 164:575-584 en Nilsson. 1969. Biochim. Biophys. Acta 187: 113-121).

15 Het is bekend dat sphingosine en sphingosine-analoga de groei en metastase van menselijke- en dierlijke tumorcellen kunnen remmen (zie bijvoorbeeld EP 0 381 514). Tevens is bekend dat toevoeging van sphingomyeline aan het voedsel van ratten de kans op kwaadaardige, chemisch geïnduceerde darmkanker aanmerkelijk kan verlagen.

20 Sphingolipiden worden eveneens toegepast in farmaceutische samenstellingen ter bescherming van huid en/of haar tegen de schadelijke effecten van luchtverontreiniging (zie bijvoorbeeld US 5.869.034).

De antimicrobiële werking van sphingosine als bestanddeel van de hoornlaag van de huid op bacteriën als *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* en *Propionibacterium acnes* is bekend o.a. uit de dermatologie 25 (Bibel et al. 1992. J. Invest. Dermatol. 98(3):269-73; Bibel et al. 1995. Clin Exp Dermatol 20(5):395-400). De toepassing van topicale zalven voor het bestrijden van huidinfecties is daarin beschreven.

Verrassenderwijs is nu echter gevonden dat bepaalde 30 sphingolipiden een selectieve afdodende werking op micro-organismen



hebben, en dat deze selectieve afdodende werking eveneens in de dikke darm wordt waargenomen, zodat daarmee een werkwijze wordt verschaft waarmee de samenstelling van de darmflora kan worden gemodificeerd en verbeterd.

- 5                   Met de samenstelling van de darmflora van een vogel of een zoogdier wordt in de onderhavige uitvinding de groepsopbouw van de gemeenschap van micro-organismen bedoeld die zich in het maagdarmkanaal van genoemde vogel of van genoemd zoogdier bevindt en die kenmerkend verschillende groepen micro-organismen omvat, welke
- 10   groepsopbouw zich in een in hoofdzaak stabiele toestand in een in hoofdzaak stabiele omgevingsconditie bevindt en karakteristiek is voor een bepaalde vogel of voor een bepaald zoogdier.

- Met een groep van micro-organismen wordt hierin een groep micro-organismen bedoeld die onderscheiden kan worden ten opzichte van
- 15   een andere groep op basis van één of meer specifieke genotypische of fenotypische kenmerken. Een dergelijke groep kan een taxonomische groep zoals een fylum, een familie, een geslacht, een soort of een stam omvatten, maar tevens een groep die methodologisch geclassificeerd wordt zoals een fylogenetisch cluster, een ribotype, een isolaat, een serotype, of een
- 20   morfotype.

- Bij de bepaling van een samenstelling van een microbiële populatie kan de verhouding waarin de verschillende groepen ten opzichte van elkaar in de populatie voorkomen bepaald worden maar ook het aandeel van een groep in de populatie. Een verhouding of aandeel kan bijvoorbeeld
- 25   worden uitgedrukt in een celaantal, maar ook in een gewicht van een cel of een celcomponent, zoals een gewicht van een nucleïnezuur, of een fluorescentie-intensiteit. De vakman zal begrijpen dat de wijze waarop een samenstelling van een microbiële populatie wordt uitgedrukt afhankelijk is van de methode waarmee deze samenstelling wordt bepaald.

Een verbetering van de darmflora is hierin gedefinieerd als een verandering van de samenstelling van de darmflora van een vogel of een zoogdier, waarbij het aandeel in de populatie van schadelijke bacteriën wordt verminderd, of als stabilisering van de darmflora in een toestand  
 5 waarin deze in balans is. De vakman is bekend welke bacteriën in het algemeen als gezond voor de darmflora worden onderkend (e.g. *Lactobacillus* en *Bifidobacterium* spp.) en welke bacteriën in het algemeen als schadelijk voor de darmflora worden onderkend (e.g. *Clostridium difficile*). Zo worden schadelijke bacteriën in verband gebracht met het  
 10 ontstaan van diarree, infecties aan het maag-dramkanaal, leverbeschadiging en/of darmkanker, terwijl gezonde of nuttige bacteriën in verband worden gebracht met remming van de groei van schadelijke bacteriën, het stimuleren van immunologische functies, het verlagen van problemen als gevolg van zwelling door gas, het verbeteren van de vertering  
 15 en absorptie van voedingsstoffen en de synthese van vitaminen.

De onderhavige uitvinding verschaft een werkwijze voor het verbeteren van de samenstelling van de darmflora van een vogel of een zoogdier. Deze werkwijze omvat het toedienen aan genoemde vogel of aan genoemd zoogdier, inclusief mensen, van een farmaceutisch preparaat of een  
 20 voedingsmiddel dat een sphingolipide of een precursor, een derivaat, of geschikt zout daarvan omvat, welk sphingolipide is gekozen uit de groep bestaande uit fytosphingosine, sphingosine, lyso-sphingomyeline en sphinganine, en in welk voedingsmiddel genoemd sphingolipide overaanwezig is.

25 De term "overaanwezig" of "overaanwezigheid" heeft betrekking op een gehalte van een bestanddeel in een samenstelling dat hoger is dan van nature of normaal of zonder menselijke tussenkomst in een dergelijke samenstelling aanwezig zou zijn of daarin zou worden aangetroffen. De overaanwezigheid van een bestanddeel kan ontstaan door de specifieke  
 30 toevoeging van een bestanddeel aan een samenstelling die dat bestanddeel

normaal niet omvat, d.w.z. door een verrijking van die samenstelling met dat bestanddeel. Overaanwezigheid van een bestanddeel kan tevens ontstaan door de specifieke toevoeging van een bestanddeel aan een samenstelling die dat bestanddeel normaal reeds omvat maar waarvan de  
5 concentratie of het gehalte door de toevoeging wordt verhoogd tot waarden die normaal niet in een dergelijke samenstelling aanwezig zijn, ook hier is sprake van verrijking van de samenstelling met het bestanddeel.

Omdat de gehalten van sphingolipides als fytosphingosine, sphingosine, lyso-sphingomyeline of sphinganine in verschillende  
10 voedingsmiddelen sterk verschillen geldt niet een algemene waarde voor het gehalte waarbij sprake zal zijn van overaanwezigheid van, of verrijking met een bepaald sphingolipide. Zo zal in bijvoorbeeld melk, dat normaal vrij veel sphingomyeline bevat, bij een hoger gehalte sprake zijn van overaanwezigheid dan in bijvoorbeeld een aardappel waarin voornamelijk  
15 cerebrosides aanwezig zijn.

Een "farmaceutisch preparaat" is hierin gedefinieerd als een samenstelling omvattende een farmaceutisch actief bestanddeel en excipiëntia, welke samenstelling voor toediening aan het lichaam van een vogel of een zoogdier is geschikt gemaakt en welke samenstelling wordt  
20 toegediend voor een specifieke therapeutische toepassing.

Een farmaceutisch preparaat volgens de onderhavige uitvinding is een samenstelling omvattende een sphingolipide, gekozen uit de groep bestaande uit fytosphingosine, sphingosine, lyso-sphingomyeline en sphinganine als een farmaceutisch actief bestanddeel en excipiëntia, en  
25 welke samenstelling, bij voorkeur oraal, kan worden toegediend ter verbetering van de samenstelling van de darmflora van genoemde vogel of genoemd zoogdier.

Een "voedingsmiddel" is hierin gedefinieerd als een oraal in te nemen voedend bestanddeel dat zelfstandig of naast de gewone voeding  
30 ingenomen kan worden en in die laatste vorm ook voedingssupplement

genoemd kan worden. De samenstelling van een voedingsmiddel verschilt echter niet wezenlijk van een voedingssupplement.

In de onderhavige uitvinding is een "voedingssupplement" gedefinieerd als een samenstelling die aanvullend aan de normale voeding  
5 kan worden geconsumeerd en bestanddelen omvat die niet, in geringe mate of in onvoldoende mate in de normale voeding voorkomen en waarvan voldoende of verhoogde consumptie gewenst is. Bij voorkeur is een voedingssupplement een voor menselijke consumptie geschikte samenstelling die sphingolipiden in verhoogde concentraties of in  
10 overaanwezigheid omvat. Een voedingssupplement volgens de onderhavige uitvinding kan tevens andere voor menselijke consumptie geschikte eigenschappen bezitten zoals bijvoorbeeld textuur, smaak en reuk, en bijvoorbeeld ook voedingswaarde. Een voedingssupplement kan tevens voor dierlijke consumptie geschikt zijn.

15 Bij de toepassing van sphingolipiden volgens uitvoeringsvormen van de onderhavige uitvinding geniet de toepassing van een geschikt zout van een sphingolipide de voorkeur omdat de zoutvorm een grote invloed heeft op de oplosbaarheid en dus op de snelle beschikbaarheid van de verbinding.

20 Een "geschikt zout" is hierin gedefinieerd als een zout waarin de gewenste biologische activiteit van het sphingolipide behouden blijft en minimale ongewenste toxicologische effecten heeft. Niet-beperkende voorbeelden van een dergelijk zout zijn (a) zuur-toevoegingszouten gevormd met anorganische zuren (bijvoorbeeld, zoutzuur, waterstofbromide,  
25 zwavelzuur, fosforzuur, salpeterzuur, en dergelijke), en zouten gevormd met organische zuren zoals azijnzuur, oxaalzuur, wijsteenzuur, barnsteenzuur, appelzuur, ascorbinezuur, benzoëzuur, tanninezuur, palmitinezuur, polyglutaminezuur, naftaleensulfonzuur, naftaleendisulfonzuur en polygalacturonzuur; (b) base-toevoegingszouten gevormd met metaal  
30 kationen zoals zink, calcium, bismut, barium, magnesium, aluminium,

koper, kobalt, nikkel, cadmium, natrium, kalium en dergelijke, of met een kation gevormd uit ammonia, N,N-dibenzylethyleen-diamine, D-glucosamine, tetraethylammonium of ethyleendiamine; of (c) combinaties van (a) en (b); bijvoorbeeld een zink tannaat of dergelijke.

5           Een "derivaat" of "analoog" is hierin gedefinieerd als een sphingolipide dat is onderworpen aan chemische modificatie. Derivatisering kan de substitutie omvatten van bepaalde chemische groepen aan het sphingolipide. Dergelijke derivatiseringen zijn bekend in de stand der techniek. De derivaten en analogen behouden de biologische activiteit van  
10 het natuurlijk sphingolipide en functioneren op vergelijkbare wijze maar kunnen voordelen aan het molecuul verschaffen zoals een langere levensduur, een resistentie tegen afbraak of een verhoogde activiteit.

          Een "precursor" is hierin gedefinieerd als een derivaat waarvan specifiek de weerstand tegen afbraak door bijvoorbeeld het  
15 spijsverteringskanaal of andere afbraaksystemen van het lichaam is verhoogd als gevolg van bijvoorbeeld chemische modificatie van het molecuul. Een dergelijke precursor kan door het lichaam of in het lichaam door bijvoorbeeld enzymatische afbraak worden omgezet in een sphingolipide gekozen uit de groep bestaande uit fytosphingosine,  
20 sphingosine, lyso-sphingomyeline of sphinganine of een derivaat daarvan dat selectieve antimicrobiële activiteit vertoont in de darm en zodoende de samenstelling van de darmflora kan verbeteren.

          Een bekend probleem dat samenhangt met de toediening van sphingolipiden is dat zij kunnen worden gemetaboliseerd, zoals hierboven  
25 beschreven, voordat zij de plaats bereiken waar zij hun therapeutische werking kunnen doen. Dit is in het bijzonder een probleem voor de toepassing van sphingolipiden in het spijsverteringskanaal.

          Dit probleem kan worden opgelost door een sphingolipide, of een analoog of een fysiologisch derivaat daarvan, alleen of in combinatie, als een  
30 zgn. precursor verbinding toe te dienen welke verbinding bepaalde

substituenten omvat waardoor de verbinding niet of in mindere mate kan worden gemetaboliseerd. Deze precursors zijn bij voorkeur resistent tegen hydrolyse in de bovenste delen van het spijsverteringskanaal, en worden bijvoorbeeld relatief gemakkelijk gesplitst in het coecum en colon, indien de

5 actieve verbinding zijn therapeutische werking vooral in het coecum en colon heeft. Hierdoor wordt de hoeveelheid verbinding die op de plaats aankomt waar de actieve verbinding zijn therapeutische werking heeft verhoogd. Zo kan bijvoorbeeld een precursor worden toegepast die *in vivo* kan worden gesplitst door een geschikt enzym waardoor een actieve

10 sphingolipide gekozen uit de groep bestaande uit fytosphingosine, sphingosine, lyso-sphingomyeline en sphinganine wordt vrijmaakt. Een dergelijke werkwijze is o.a. bekend uit WO 99/41266. Een geschikte precursor is bijvoorbeeld sphingomyeline of een derivaat of een geschikt zout daarvan, dat bijvoorbeeld door sphingomyelinase kan worden omgezet

15 in sphingosine.

De oorsprong van de sphingolipiden heeft geen invloed op hun bruikbaarheid voor de huidige uitvinding. Zo kan fytosphingosine uit bijvoorbeeld *Pichia ciferii* worden gewonnen (zie bijvoorbeeld US 6 204 006). Verder kan lyso-sphingomyeline uit bijvoorbeeld eieren worden verkregen

20 na chemische of enzymatische hydrolyse van de N-acyl binding van sphingomyeline. In principe is iedere oorsprong geschikt en kunnen sphingolipiden tevens uit bijvoorbeeld melk, bloed, vlees, hersenen of soja worden geïsoleerd voor toepassing in een voedingsmiddel, voedingssupplement, farmaceutisch preparaat of werkwijze volgens de

25 uitvinding.

Ook sphingolipiden en sphingolipide-derivaten, of precursors of geschikte zouten daarvan die synthetisch (chemisch) bereid zijn, kunnen toegepast worden in de onderhavige uitvinding.

Werkwijzen voor het bereiden van sphingolipiden en

30 sphingolipide derivaten zijn onder andere bekend uit EP 0 940 409, WO

98/03529 en WO 99/50433 en de vakman zal in staat zijn om middels bekende wijze derivaten te vervaardigen en deze te testen op verhoogde antimicrobiële werking, op selectievere werking of op verminderde bijwerking ter verkrijging van sphingolipide derivaten die kunnen worden  
5 toegepast in de onderhavige uitvinding.

Bepaalde sphingolipiden, zoals sphingosine, sphinganine en vooral sphingomyeline, zijn reeds van nature aanwezig in voedingsmiddelen die door veel zoogdieren worden gegeten. Zo bevat koemelk 100-200 nmol/mL sphingomyeline (Zeisel et al. 1986. J. Nutr. 116:50-58) ofwel  
10 ongeveer 0,01 gew.%. Sphingomyeline is meest voorkomende complexe sphingolipide in melk, terwijl de sphingosine de meest voorkomende vrije sphingoïde base vormt. De totale hoeveelheden sphingomyeline en sphingosine in melk zijn ongeveer gelijk. "Nonfat dry milk" bevat ca. 0,004 gew.% sphingosine.

15 In soja daarentegen is de vrije sphingosinefractie slechts ongeveer 0,2 % van de hoeveelheid sphingomyeline, die ongeveer 500 nmol/g drooggewicht ofwel 0,03-0,04 gew.% bedraagt (Ahn en Schroeder. 2002. J Food Sci 67:522-524). Niet ieder voedingsmiddel bevat dus evenveel sphingolipide en niet ieder sphingolipide is in gelijke hoeveelheid in  
20 verschillende voedingsmiddelen aanwezig. De hoeveelheid sphingosine die van nature aanwezig is in sojameel (1,3 nmol/g drooggewicht, ofwel ca 0,00004 gew.%; Ahn en Schroeder. 2002. J. Food Sci. 67:522-524) is te laag om toegepast te kunnen worden in een werkwijze volgens de onderhavige uitvinding.

25 Om sojameel dus als voedingsmiddel in een werkwijze volgens de onderhavige uitvinding toe te passen moet van dat sojameel het gehalte van één of meer sphingolipiden gekozen uit de groep bestaande uit fytosphingosine, sphingosine, lyso-sphingomyeline en sphinganine worden verhoogd tot een concentratie waarbij na consumptie van dat sojameel door  
30 een vogel of een zoogdier, inclusief een mens, de darmflora door de activiteit

van genoemd sphingolipide wordt verbeterd, of dat specifieke bacteriën in genoemde darmflora daardoor worden afgedood of daardoor althans sterk worden geremd in hun groei. Daartoe dienen één of meer van genoemde sphingolipiden tot overaanwezigheid te worden gebracht in dat sojameel.

- 5 Hiertoe kan aan sojameel een bepaalde hoeveelheid van genoemd sphingolipide worden toegevoegd, of kan bijvoorbeeld een genetisch gemodificeerde variant van een sojaplant gekweekt worden waarvan de bonen een verhoogd gehalte van genoemd sphingolipide produceren, waarna uit genoemde bonen een sojameel met verhoogd gehalte of overaanwezigheid
- 10 aan genoemd sphingolipide kan worden verkregen. Vele werkwijzen zijn in principe geschikt om een sphingolipide in een voedingsmiddel overaanwezig te maken of tot overaanwezigheid te brengen.

Er werd gevonden dat op agarplaten de groei van de geteste bacteriën reeds bij een concentratie sphingolipide gehalte van 20 ppm werd

15 geremd. Verder werd gevonden dat de darminhoud van een varken, dat werd gevoederd met 1 gew.% (ca. 10000 ppm) fytosphingosine in het voedsel, aan het einde van de dunne darm een hoeveelheid fytosphingosine van ca. 77 ppm/gram drooggewicht kon bevatten. Ondanks de afbraak van het fytosphingosine in het maagdarmkanaal blijkt dat er voor een

20 antimicrobiële werking en dus voor een verbetering van de samenstelling van de darmflora ruimschoots voldoende overblijft.

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een voedingsmiddel waarin één of meer sphingolipiden gekozen uit de groep bestaande uit fytosphingosine, sphingosine, lyso-sphingomyeline en

25 sphinganine, of een precursor, een derivaat, of geschikt zout daarvan, overaanwezig zijn. In een voorkeursuitvoeringsvorm omvat een dergelijk voedingsmiddel van 0,05 tot 50 gew.%, bij voorkeur van 0,1 tot 10 gew.%, bij grotere voorkeur 1 tot 5 gew.% van een sphingolipide gekozen uit de groep bestaande uit fytosphingosine, sphingosine, lyso-sphingomyeline en

30 sphinganine of derivaten, precursors of geschikte zouten daarvan.



In een voedingsmiddel volgens de uitvinding worden één of meer sphingolipiden gekozen uit de groep van fytosphingosine, sphingosine, lyso-sphingomyeline en sphinganine in ieder geval toegepast in een effectieve hoeveelheid om een groei-remmende of afdodende werking op de gewenste micro-organismen in de darm te hebben.

In een voorkeursuitvoeringsvorm omvat een voedingsmiddel volgens de onderhavige uitvinding het sphingolipide fytosphingosine.

Indien een voedingsmiddel volgens de uitvinding wordt toegepast als diervoeding kan het voedingsmiddel bijvoorbeeld in de vorm van een korrel, een wafel, een pap, een brok, een brei, een pasta, een vlok, een koek, een (lik)blok, een suspensie of een siroop worden toe bereid.

Voor toediening aan mensen kan een het sphingolipide zeer geschikt in de vorm van een voedingssupplement worden toe bereid.

Aan een voedingsmiddel en voedingssupplement omvattende een sphingolipide kunnen bestanddelen die bijvoorbeeld de textuur, smaak of geur verbeteren aan worden toegevoegd. Zo kan een voedingsmiddel volgens de uitvinding tevens bronnen van eiwit, koolhydraat en vet, alsmede vitaminen, mineralen, elektrolyten, sporenelementen, en andere geschikte toevoegingen omvatten, zodanig dat het voedingsmiddel in de vorm van een voedingssupplement met voedende bestanddelen kan worden toegepast.

Als bron van eiwit kan in principe ieder eiwit dat geschikt is voor toepassing in voedingsformuleringen en mengsels daarvan worden toegepast in een voedingssupplement volgens de uitvinding. Dergelijke eiwitten omvatten bijvoorbeeld dierlijk eiwit, zoals wei-eiwit, wei-eiwit concentraat, wei poeder, ei-eiwit, eialbumine, caseïne of melkalbumine, en plantaardig eiwit, zoals soja-eiwit, sojameel of eiwit uit sojamelk. Bij de keuze van de eiwitbron kan de biologische waarde van het eiwit een belangrijk criterium zijn waarbij bijvoorbeeld caseïnaat, waaronder calcium caseïnaat, maar tevens wei, melkalbumine, eialbumine en gehele ei-eiwitten

tot de eiwitten met de hoogste biologische waarde behoren, omdat zij een hoog gehalte aan essentiële aminozuren bevatten.

Geschikte koolhydraten voor toepassing in een voedingssupplement volgens de uitvinding omvatten bijvoorbeeld simpele  
 5 korte keten koolhydraten zoals mono- en disacchariden maar tevens polysacchariden, of een combinatie daarvan. Een suiker kan worden gekozen vanwege gewenste organoleptische eigenschappen. Een complex polysaccharide kan bijvoorbeeld geschikt worden toegepast als voedingsvezel. Een voedingssupplement volgens de uitvinding kan in  
 10 bepaalde uitvoeringsvormen ook combinaties van complexe en simpele koolhydraten omvatten.

Als (additionele) vetten kunnen in principe alle mogelijke voor consumptie geschikte vetten en oliën worden toegepast.

Vitaminen en mineralen kunnen bijvoorbeeld worden toegevoegd  
 15 aan de voedingssupplement conform de geldende regelgeving van gezondheidsautoriteiten en kunnen alle door die instanties aanbevolen vitaminen en mineralen omvatten, zoals de vitaminen A, B1, B2, B12, folinezuur, niacine, panthoteenzuur, biotine, C, D, E en K. Als mineralen kunnen bijvoorbeeld ijzer, zink, jodium, calcium, magnesium, chroom en  
 20 selenium worden toegevoegd.

Elektrolieten als natrium, kalium en chloriden, en sporenelementen en ander toevoegingen kunnen eveneens zijn omvat in een voedingssupplement volgens de uitvinding en worden, indien daarin aanwezig, bij voorkeur toegepast in de voor deze stoffen aanbevolen  
 25 hoeveelheden. Tevens kan een voedingssupplement volgens de uitvinding bestanddelen omvatten zoals textuur verbeterende bestanddelen, kleurstoffen, geurstoffen, smaakstoffen, specerijen, vulmiddelen, emulgatoren, stabilisatoren, conserveermiddelen, anti-oxidanten, voedingsvezels, en andere voedingssupplementen als aminozuren, choline,  
 30 lecithine, vetzuren etc. De keuze voor dergelijke bestanddelen is een kwestie

van formulering, ontwerp en voorkeur. De hoeveelheden die van dergelijke bestanddelen kunnen worden toegevoegd zijn bij de vakman bekend, waarbij de keuze bijvoorbeeld geleid kan worden door de aanbevolen dagelijkse hoeveelheden (RDA doseringen) voor kinderen en volwassenen.

5           Emulgatoren kunnen worden toegevoegd voor stabiliteit van het eindproduct. Voorbeelden van geschikte emulgatoren omvatten bijvoorbeeld lecithine (e.g., van ei of soja), en/of mono- en di-glycerides. Als stabilisatoren kunnen bijvoorbeeld carob-, guar- en carageengom worden toegepast.

10           Conserveermiddelen kunnen eveneens worden toegevoegd ter verlenging van de houdbaarheid van het product. Bij voorkeur worden conserveermiddelen als kaliumsorbaat, natriumsorbaat, kaliumbenzoeaat, natriumbenzoeaat of calcium dinatrium EDTA toegepast.

15           In aanvulling op de bovenvermelde koolhydraten kan het voedingssupplement natuurlijke of synthetische zoetstoffen omvatten zoals saccharides, cyclamaten, aspartamine, aspartaam, acesulfaam K, en/of sorbitol.

20           Porties voor inname van het voedingssupplement kunnen in omvang variëren en zijn niet beperkt tot de waarden die behoren bij de aanbevolen hoeveelheden. De term "voedingssupplement" is hierin niet bedoeld te zijn beperkt tot een specifiek gewicht of specifieke dosering van het voedingssupplement.

25           Een samenstelling van een voedingssupplement volgens de uitvinding kan in principe iedere vorm aannemen die geschikt is voor consumptie door mensen of dieren. Een geschikte uitvoeringsvorm is een samenstelling in de vorm van een droog poeder dat te suspenderen, te dispergeren of te emulgeren is in een waterige vloeistof zoals water, koffie, thee, bouillon of vruchtensap. Hiertoe kan een dergelijk poeder in een doseerverpakking worden verschaft.

30           In een alternatieve voorkeursuitvoeringsvorm wordt de samenstelling in de vorm van een droog poeder getabletteerd. Daartoe kan

een samenstelling voor een voedingssupplement volgens de uitvinding zeer geschikt worden voorzien van vulmiddelen, zoals microkristallijne cellulose (MCC) en mannitol, bindmiddel, zoals hydroxypropylcellulose (HPC), en smeermiddelen, zoals stearinezuur of andere excipiëntia.

5                Een samenstelling van een voedingssupplement volgens de uitvinding kan tevens worden verschaft in een vloeibaar preparaat waarin de vaste bestanddelen in een waterige vloeistof gesuspendeerd, gedispergeerd of geëmulgeerd zijn. Een dergelijke samenstelling kan direct door een ander voedingsmiddel worden gemengd of kan bijvoorbeeld  
10                geëxtrudeerd worden en verwerkt tot korrels of andere vormen.

                 In een alternatieve uitvoeringsvorm kan een voedingssupplement in de vorm van een vast voedingsmiddel, zoals een reep, koekje of een broodje zijn uitgevoerd.

                 In een farmaceutisch preparaat of een voedingssupplement dat  
15                kan worden toegepast in een werkwijze volgens de onderhavige kunnen één of meer sphingolipiden gekozen uit de groep van fytosphingosine, sphingosine, lyso-sphingomyeline en sphinganine worden toegepast in een farmaceutisch effectieve hoeveelheid om een afdodende werking op de gewenste micro-organismen te hebben en de samenstelling van de darmflora  
20                te verbeteren.

                 Een farmaceutisch effectieve hoeveelheid in een farmaceuticum is de hoeveelheid in dat farmaceuticum die resulteert in een effectieve concentratie van bijvoorbeeld een actief fytosphingosine in de darm van 10 tot 50 ppm.

25                In een farmaceuticum, of in een voedingsmiddel of voedingssupplement, kan het sphingolipide zeer geschikt als een precursor worden toegepast zodat de effectieve hoeveelheid van de actieve vorm van het sphingolipide dat de dikke darm kan bereiken wordt verhoogd.

                 Een farmaceutisch preparaat dat kan worden toegepast in een  
30                werkwijze volgens de uitvinding kan geschikt 0,01 tot 99,9 gew.% van een

sphingolipide gekozen uit de groep bestaande uit fytosphingosine, sphingosine, lyso-sphingomyeline en sphinganine omvatten. Bij voorkeur omvat een farmaceutische samenstelling één of meer sphingolipiden gekozen uit de groep van fytosphingosine, sphingosine, lyso-sphingomyeline en sphinganine, of een precursor, een derivaat of een (farmaceutisch) geschikt zout daarvan, in een hoeveelheid van 0,01 tot 10 gew.%, bij grotere voorkeur van 0,1 tot 1 gew.%, en één of meer excipiëntia.

Bij voorkeur is een farmaceutische samenstelling volgens de uitvinding bestemd of gericht op orale toediening. Samenstellingen voor orale toediening zullen doorgaans een inert verdunningsmiddel of een eetbare drager omvatten. De samenstellingen kunnen zijn verpakt in bijvoorbeeld gelatine capsules of kunnen zijn getabletteerd in de vorm van tabletten. Voor orale therapeutische toediening kan de actieve verbinding worden toegediend met excipiëntia en bijvoorbeeld gebruikt in de vorm van tabletten, pastilles of capsules. Farmaceutische geschikte bindmiddelen en/of adjuvantia en kunnen eveneens worden toegevoegd als bestanddeel van de samenstelling.

De tabletten, pillen, pastilles, capsules en dergelijke kunnen ieder van de volgende bestanddelen omvatten of verbindingen van gelijke strekking: een vulmiddel zoals microkristallijne cellulose (MCC) of mannitol; een bindmiddel zoals hydroxypropylcellulose (HPC), tragacanth gom of gelatine; een excipient zoals zetmeel of lactose; een desintegreermiddel zoals alginaat of maïszetmeel; een smeermiddel zoals magnesium stearaat; een zoetstof zoals sucrose of saccharose; of een smaakstof zoals pepermunt of methyl salicylzuur. Wanneer een doseervorm in de vorm van een capsule wordt toegepast kan deze, naast de bovengenoemde bestanddelen een vloeibare drager zoals een olie omvatten. Voorts kunnen de doseervormen zijn uitgevoerd met bijvoorbeeld bekledingslagen van suiker, schellak of andere middelen. De bestanddelen

van de farmaceutische samenstelling worden bij voorkeur zo gekozen dat zij de gewenste werking van het sphingolipide niet verminderen.

Voor een oraal farmaceuticum kunnen één of meer sphingolipiden of derivaten of (farmaceutische) geschikte zouten daarvan tevens worden  
5 toegediend in de vorm van bijvoorbeeld een elixer, een suspensie, een siroop, een wafel of een kauwgom.

In een derde aspect heeft de onderhavige uitvinding betrekking op de toepassing van een sphingolipide gekozen uit de groep bestaande uit fytosphingosine, sphingosine, lyso-sphingomyeline en sphinganine, voor de  
10 bereiding van een geneesmiddel ter verbetering van de samenstelling van de darmflora.

Dit aspect van de uitvinding vindt zijn basis in het selectieve karakter van de bacteriedodende werking van de sphingolipiden volgens de uitvinding in de darm. De selectieve afdoding van bepaalde typen micro-  
15 organismen maakt een sphingolipide, toegepast volgens dit aspect van de uitvinding, uitermate geschikt om de darmflora te verbeteren.

Met het verbeteren van de darmflora wordt in de onderhavige uitvinding bedoeld het selectief afdoden of remmen van schadelijke of ongewenste of voor darmgezondheid niet essentiële micro-organismen in de  
20 darm, zodanig dat de nuttige, gewenste en voor een goed functioneren van de darmflora essentiële micro-organismen niet worden beïnvloed, en waarbij door de afdoding van de genoemde micro-organismen de (soorten)samenstelling van de darmflora in een gewenste richting wordt gemodificeerd. Naast een bacteriocidische werking van het sphingolipide  
25 wordt in de onderhavige uitvinding eveneens een bacteriostatische werking van het sphingolipide voorzien.

Zo kan door toepassing van een sphingolipide volgens de uitvinding de aanwezigheid *C. difficile* worden bestreden, terwijl de aanwezigheid van *Lactobacillus* soorten, die algemeen als nuttige  
30 organismen in de darm worden aangeduid, niet wordt beïnvloed.

Voorts kan de aanwezigheid van bijvoorbeeld bepaalde Gram positieve bacteriesoorten in de darmflora worden teruggedrongen door toepassing van een farmaceutische samenstelling of een voedingsmiddel of voedingssupplement volgens de uitvinding. Hierdoor is het mogelijk om de  
5 aanwas van bepaalde dieren te bevorderen zonder dat antibiotica behoeven te worden toegepast.

In een vierde aspect heeft de onderhavige uitvinding betrekking op een werkwijze voor de bereiding van een voedingsmiddel of voedingssupplement volgens de uitvinding, omvattende het verwerken van  
10 een sphingolipide gekozen uit de groep bestaande uit fytosphingosine, sphingosine, lyso-sphingomyeline en sphinganine, of een precursor of derivaat daarvan, in een voedingsmiddel of voedingssupplement.

In een werkwijze voor de bereiding van een voedingsmiddel volgens de uitvinding kan het voedingsmiddel eerst afzonderlijk worden  
15 bereid en daarna worden samengevoegd met een sphingolipide ter verkrijging van een voedingsmiddel volgens de uitvinding waarbij genoemd sphingolipide in het voedingsmiddel is verwerkt. Het voedingsmiddel kan vooraf afzonderlijk worden bereid op gebruikelijke wijzen zoals mengen, bakken, frituren, koken, stomen, braden of pocheren en kan indien nodig  
20 voor het samenbrengen met een sphingolipide ter verkrijging van een voedingsmiddel volgens de uitvinding worden afgekoeld. Volgens een andere bruikbare uitvoeringsvorm wordt een sphingolipide tijdens de bereiding van het voedingsmiddel als een bestanddeel daarin verwerkt.

Aan gewone voedingsmiddelen zoals melk of sojameel kunnen  
25 eveneens sphingolipiden worden toegevoegd ter verkrijging van een voedingsmiddel volgens de uitvinding. Sphingolipiden kunnen daartoe bijvoorbeeld uit dergelijke voedingsmiddelen gezuiverd worden en deze gezuiverde sphingolipide-preparaten kunnen worden toegepast voor het bereiden van een voedingsmiddel volgens de uitvinding.

Zeer geschikt kunnen eveneens transgene gewassen of genetisch gemodificeerde organismen worden toegepast voor het verhogen van het natuurlijk gehalte aan sphingolipiden in bepaalde voedinggewassen of voedingsmiddelen die worden toegepast in uitvoeringsvormen volgens de uitvinding of om te dienen als bron voor daaruit te zuiveren sphingolipide.

Een werkwijze voor de bereiding van een geneesmiddel of farmaceuticum dat kan worden toegepast ter verbetering van de samenstelling van de darmflora omvat bijvoorbeeld het mengen van de bestanddelen en het tabletteren van het mengsel, eventueel gevolgd door het coaten van de aldus verkregen tabletten. De bereiding van geneesmiddelen die middels alternatieve toedieningsvormen worden gedoseerd zijn bij de vakman bekend. Op basis van de onderhavige beschrijving is de vakman in staat eveneens een werkwijze voor de bereiding van een voedingssupplement te formuleren. Een dergelijke werkwijze zal bijvoorbeeld de stappen omvatten van het mengen van de ingrediënten en het doseren van de aldus verkregen samenstelling.

De hoeveelheid sphingolipide die wordt verwerkt in een voedingsmiddel volgens de uitvinding is afhankelijk van het soort sphingolipide en van de toepassing die wordt voorzien en de vakman zal in staat zijn om deze hoeveelheid te bepalen in het licht van de onderhavige beschrijving.

Een zeer geschikte concentratie in de darm voor het verbeteren van de samenstelling van de darmflora volgens de onderhavige uitvinding is een concentratie aan sphingolipide van 10 tot 50 ppm. Met dergelijke concentraties kan zeer effectieve en selectieve afdoding van specifieke soorten van bacteriën worden bereikt. De toepassing volgens de uitvinding voorziet in verbetering van de intestinale microflora, in bevordering van de darmgezondheid en in bestrijding van darminfecties.

Bij voorkeur is de toepassing van de onderhavige aanvraag gericht op het modifieren van bacteriële populaties door toediening van een



sphingolipide zoals hierboven gedefinieerd, bijvoorbeeld als antibioticum in voeding of in medicamenten om een balans in de darmflora te behouden of te verkrijgen.

De uitvinding zal nu worden geïllustreerd aan de hand van de  
5 volgende, niet als beperkend op te vatten voorbeelden.

## VOORBEELDEN

### Voorbeeld 1. Antimicrobiële werking van sphingolipiden.

10 De antimicrobiële activiteit van fytosphingosine, sphingomyeline, sphinganineacetaat, sphingosine, glucosylceramide III, en lyso-sphingomyeline werd getest op agarplaten, in vloeibare culturen, in het dunnedarmmodel TIM-1 en in het dikkedarmmodel TIM-2 (EP 0 642 382 and US 5,525,305).

15 De agarplaten werden bereid door het droge materiaal in water op te lossen of te suspenderen en de agar na sterilisatie uit te gieten in petrischalen volgens standaard procedures. De volgende media werden gebruikt: Brain Heart Infusion Broth (BHI; Oxoid CM 225), Clostridium  
difficile Agar (DFA; Oxoid CM 601 + SR 96), De Man-Rogosa-Sharpe Broth  
20 (MRS; Oxoid CM 359), De Man-Rogosa-Sharpe Agar (MRSA; Oxoid CM 361), Plate Count Agar (PCA; Oxoid CM 325), Reinforced Clostridial Broth (RCB; Oxoid CM 149), Rogosa Agar (Oxoid CM 627), Trypton Soy Agar (TSA; Oxoid CM 131).

Reinforced Clostridial Blood Agar (RCBA) werd bereid door 52,5 g  
25 Reinforced Clostridial Agar (RCA; Oxoid CM 151) en 5 g glucose te suspenderen in 850 mL gedemineraliseerd water. De suspensie werd geautoclaveerd gedurende 15 min bij 121 °C. Na afkoeling tot ongeveer 50 °C werd een hoeveelheid van 75 mL steriel paardenbloed (Oxoid SR 50) en 75 mL van een steriele 0.4 % (w/v) China blauw oplossing toegevoegd. De  
30 agaroplossing werd gegoten in petrischalen volgens standaard procedures.

In een eerste vooronderzoek werden de sphingolipiden gebruikt om hun antimicrobiële activiteit op agarplaten te bepalen. Hiertoe werden TSA, MRSA en RCBA agarplaten spiraalsgewijs met ethanoloplossingen van de sphingolipiden beladen op zo'n manier dat de concentratie als functie  
 5 van de plaats op de plaat veranderde van hoog aan de buitenzijde van de platen naar laag in het centrum van de platen.

Door vloeibare culturen van de bacteriën, opgekweekt in BHI, MRS of RCB, met bekende celdichtheden (ca.  $4 \times 10^8$  kolonie vormende eenheden [k.v.e.]) aan te brengen van de rand van de plaat en uit te strijken  
 10 richting het middelpunt van de plaat (als spaken in een wiel) kon de "minimal inhibiting concentration" (MIC) worden bepaald aan de hand van de plaats op de agarplaat waar geen bacteriegroei meer optrad en de daarbij behorende concentratie aan sphingolipide.

De volgende bacteriën werden in BHI opgekweekt en op TSA  
 15 platen uitgestreken: *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus suis* type 2 en *Pseudomonas aeruginosa*.

De volgende melkzuurbacteriën werden in MRS opgekweekt en op MRSA platen uitgestreken: *Leuconostoc carnosum*, *Lactobacillus sake*,  
 20 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* en *Enterococcus hirae*.

De volgende anaërobe bacteriën werden in RCB opgekweekt en op RCBA platen uitgestreken: *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium* spp., *Fusobacterium nucleatum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium* spp., *Clostridium difficile* en *Bacteroides fragilis*.

25 De met sphingolipiden en bacteriën beladen PCA platen werden gedurende 48 uur aeroob bij 30 °C geïncubeerd en de MRSA en RCBA platen gedurende 72 uur onder anaërobe omstandigheden bij 30 °C.

In Tabel 1 staan de MIC-waarden (in µg/mL) van de geteste sphingolipiden voor de aërobe en anaërobe bacteriën vermeld. Geen van de  
 30 Gram-negatieve bacteriën (*E. coli* 0157:H7, *S. enteritidis* en *P. aeruginosa*)

werd door sphingolipiden geremd. *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. suis* type 2, *L. carnosum*, *B. adolescentis* en *C. difficile* werden reeds bij de laagste geteste concentraties geremd door alle sphingolipiden (0,3-6,4 µg/mL), behalve door sphingomyeline en glucosylceramide III die geen van de geteste bacteriën remmen. De antimicrobiële werking van de sphingolipiden neemt af van fytosphingosine > sphingosine > lyso-sphingomyeline = sphinganine.

Tabel 1: De MIC-waarden (µg/mL) van sphingolipiden voor Gram-negatieve, Gram-positieve en anaërobe Gram-positieve bacteriën.

Bacterie	Fyto-sphingosine	Sphingosine	Lyso-sphingomyeline	Sphinganine	Glucosylceramide III	Sphingomyeline	Controle (ethanol)
<i>E. coli</i> O157:H7	>731	>731	>365	>731	>365	>731	groei
<i>S. enteritidis</i>	>731	>731	>365	>731	>365	>731	groei
<i>P. aeruginosa</i>	>731	>731	>365	>731	>365	>731	groei
<i>L. monocytogenes</i>	6.3	<6.3	<3.1	<6.3	>365	>731	groei
<i>S. suis</i> type 2	6.3	<6.3	<3.1	<6.3	>365	>731	groei
<i>B. cereus</i>	6.3	<6.3	<3.1	<6.3	>365	>731	groei
<i>L. carnosum</i>	<0.3	<6.3	<3.1	<0.3	>365	>731	groei
<i>L. sake</i>	2.2	<6.3	20	>70	>365	>731	groei
<i>L. acidophilus</i>	>36.5	<6.3	16.6	222	>365	>731	groei
<i>L. casei</i>	>36.5	<6.3	>365	246	>365	>731	groei
<i>E. hirae</i>	>36.5	84	>365	>731	>365	>731	groei
<i>B. adolescentis</i>	8.0	<6.3	<3.1	>73	>365	>731	groei
<i>Bif. spp.</i>	0.9	<6.3	10	0.9	>365	>731	groei
<i>F. nucleatum</i>	<6.3	<6.3	>365	>731	>365	>731	groei
<i>B. fragilis</i>	2.1	<6.3	11.4	0.3	>365	>731	groei
<i>C. perfringens</i>	5.9	n.d.	n.d.	>36.5	n.d.	n.d.	geen groei
<i>C. difficile</i>	5.7	n.d.	n.d.	>73	n.d.	n.d.	groei
<i>C. spp.</i>	1.1	<6.3	<3.1	>73	>365	>731	groei

Omdat bacteriën op agarplaten veel langer worden blootgesteld aan de sphingolipiden dan wanneer ze in de darm aanwezig zouden zijn

werden enkele antimicrobiële tests in vloeibare media herhaald en werden het aantal overlevende anaërobe bacteriën (*Lactobacillus acidophilus* en *Clostridium difficile*) als functie van de blootstellingstijd bepaald.

5        Hiertoe werden de bacteriën eerst in aparte media tot een bekende celdichtheid opgekweekt en vervolgens uitverdund tot 4,7 k.v.e./mL in ileum-medium (25 g/L D-glucose, 1.5 g/L peptone (Oxoid L 41), 60 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, 6 g/L NaCl, 0.7 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,15 g/L ei-lysozym (Sigma L6876), 1.25 g/L pancreatine (Sigma P1500), 0.75 g/L agar en optioneel varkens galextract (1.5 g/L; zie experimenten, Sigma B8631).  
 10      Er werd gekozen voor een groeimedium dat wat betreft de samenstelling de inhoud van het ileum (einde van de dunne darm, net voor de dikke darm) nabootst. Het medium bevatte onder andere glucose, pepton, natriumbicarbonaat, fosfaat-zouten, ei-lysozym en pancreatine.

15        In aparte gevallen werd er ook een varkensgal-extract toegevoegd hoewel in het ileum normaal gesproken het gal al is verwijderd. Tijdens de experimenten in aanwezigheid van fytosphingosine en sphinganine werd na 1, 3 en 6 uur incubatie het aantal overlevende micro-organismen bepaald door bacteriemonsters van gelijk volume uit het medium te verwijderen en op aparte platen te enten. Het aantal anaëroob overlevende kolonies na 2 of  
 20      3 dagen bij 37 °C werd als maat voor de afdoding door de sphingolipiden van de bacteriën genomen. In Figuur 1 staat het verloop van de aantallen overlevende kolonies in de tijd afgebeeld na toevoeging van fytosphingosine of sphinganine (elk bij 2,5, 10 en 50 µg/mL).

25        Het blijkt dat gal voor beide bacteriën dodelijk is en er is geen extra bacteriedodend effect van de sphingolipiden meetbaar bij concentraties tot 50 µg/mL.

30        In afwezigheid van gal in het ileum-medium werden *Lactobacillus acidophilus* en *Clostridium difficile* door zowel fytosphingosine als door sphinganine bij concentraties 10 en 50 µg/mL binnen 200 minuten bijna volledig afgedood. Opmerkelijk is dat zonder sphingolipiden (controles) het

aantal overlevende bacteriën in het ileum-medium ook langzaam terugloopt. Door onbekende oorzaak heeft sphinganine op agarplaten (zie tabel 1) voor *Lactobacillus acidophilus* een veel hogere MIC waarde dan in een anaëroob vloeibaar medium.

5

#### Voorbeeld 2. Intestinaal transport van fytosphingosine en sphinganine.

Omdat de sphingolipiden met de voeding naar de dunne en dikke darm moeten worden getransporteerd om daar actief te kunnen zijn werd het transport van fytosphingosine en sphinganine in het maag en  
 10 dunnedarmmodel TIM-1 getest. Tevens werd het transport van fytosphingosine bij een gefisteld varken getest nadat het dier met fytosphingosine-houdende (1 gew.%) voeding was gevoederd. Bij een gefisteld varken is de dunne darm losgekoppeld van de dikke darm zodat de verteerde voeding aan het einde van de dunne darm kan worden verzameld.

15 Zowel in het TIM-1 model als in het in vitro varkensmodel werden de sphingolipiden in voldoende hoeveelheden getransporteerd om een antimicrobiële werking in de dikke darm te kunnen hebben.

Op agarplaten, zoals beschreven in Voorbeeld 1, zijn Gram-negatieve bacteriën ongevoelig voor sphingolipiden, maar Gram-positieve  
 20 bacteriën worden onder die omstandigheden alleen door fytosphingosine, sphingosine, sphinganine en lyso-sphingomyeline gedood. De typische werkzame doses liggen, afhankelijk van het sphingolipide en de bacterie, tussen de 0,3 en 20 µg/mL. Dit zijn vergelijkbare concentraties die met gangbare antibiotica worden gebruikt. In vloeibare culturen worden  
 25 *Clostridium difficile* en *Lactobacillus acidophilus* door fytosphingosine en sphinganine grotendeels binnen 200 minuten gedood (bij een concentratie van 50 ppm). In het TIM-2 dikke darm model werd *Clostridium difficile* een factor 10 tot 100 sneller gedood dan de andere aanwezige anaërobe bacteriën.

Het toevoegen van sphingolipiden (tot 1 gew.%) aan de voeding van ratten had tot gevolg dat het totale cholesterolgehalte in het bloedplasma met 30% werd verlaagd in vergelijking met de controlegroep (Vesper et al. 1999. J. Nutr. 129, 1239-1250). Zoals bekend, is een hoog  
 5 cholesterolgehalte één van de risicofactoren voor atherosclerose. Er was geen gewichtstoename meetbaar door de toevoeging van het extra sphingolipide aan het voedsel.

Er werd gevonden dat een gefisteld varken dat voeding met 1 gew.% fytosphingosine kreeg, gezond bleef en dat de darminhoud aan het  
 10 einde van de dunne darm voldoende fytosphingosine bevatte om *Clostridium difficile* te kunnen doden in de dikke darm.

### Voorbeeld 3. Antimicrobiële werking en transport van fytosphingosine en sphinganine in TIM-1

#### 15 Antimicrobiële werking in TIM-1

Aangezien fytosphingosine en sphinganine op plaat en in vloeibare culturen een sterke antimicrobiële werking hebben werden de experimenten in het dunnedarmmodel TIM-1 herhaald met 20 µg/mL sphingolipide in aanwezigheid van *Lactobacillus acidophilus* (op Rogosa  
 20 agar platen) en *Clostridium difficile* (op Clostridium difficile agar). Na het uitplaten van de lumenmonsters op de respectievelijke agarplaten bleek er geen aantoonbare antimicrobiële werking te zijn.

Vermoedelijk zijn de sphingolipiden door de lumensamenstelling (andere vetten, eiwitten, eiwitfragmenten en galzuren) of door adsorptie aan  
 25 het TIM-1 systeem zelf (zie beneden) in te lage concentraties vrij beschikbaar om hun antimicrobiële werking te vertonen. De sphingolipiden worden wel in voldoende mate in het TIM-1 systeem getransporteerd (zie beneden).

#### 30 Transport

Om te onderzoeken of sphingolipiden uit de voeding door de dunne darm worden getransporteerd zonder te worden opgenomen of chemisch of enzymatisch te worden gemodificeerd in de dunne darm werden fytosphingosine en sphinganine in een standaard TIM-1 voeding gemengd en aan een TIM-1 behandeling blootgesteld. Van elk sphingolipide 5 mg per 100 gram voeding (0.005 gew.%) in de voeding getest. Na het starten van de TIM-1 verteerprocessen in de TIM-1 maag werden op de vaste tijden lumenmonsters van 100 gram genomen. Tevens werden dialysaatmonsters genomen van het materiaal dat door het half doorlaatbare TIM-1 membraan werd getransporteerd. De dialysaatmonsters varieerden tussen de 1428 en 1122 gram. In Tabel 2 staan sphingolipidenconcentraties in de verschillende monsters vermeld zoals die middels LC-MS zijn bepaald. Bij de monsters is de blootstellingstijd in minuten vermeld.

Het gebruikte TIM-1 membraan bleek ondoorlaatbaar voor de sphingolipiden terwijl beide sphingolipiden goed werden getransporteerd door het systeem. Uit een ruwe massabalans (som van volume x concentraties) blijkt dat er maar ca. 20% van het gebruikte fytosphingosine en sphinganine wordt teruggevonden in de monsters. Een mogelijke verklaring kan zijn dat de sphingolipiden aan het plastic van de semi-permeabele membranen en aan de slangen van het TIM-1 model adsorberen. Dit is een bekend verschijnsel in TIM-1 studies met andere hydrofobe stoffen zoals carotenoiden.

Tabel 2: Concentraties sphingolipiden in de verschillende TIM-1 compartimenten tijdens het TIM-1 verteringsproces.

TIM-1 monster	Fytoshingosine (µg/mL)	Sphinganine (µg/mL)
Voeding	5,19	19,36
Lumen jejunem 60'	1,47	8,75
Lumen jejunem 120'	1,79	11,51
Lumen jejunem 180'	3,41	12,47

Lumen jejunem 240'	4,10	10,46
Dialysaat jejunem 0-120'	0	0
Dialysaat jejunem 120-240'	0	0
Lumen ileum 60'	0,20	0,74
Lumen ileum 120'	2,23	4,52
Lumen ileum 180'	2,22	5,30
Lumen ileum 240'	1,96	7,91
Dialysaat ileum 0-120'	0	0
Dialysaat ileum 120-240'	0	0
Residu maag/duodenum + spoelvlloeistof	1,03	2,73
Residu jejunem/ileum + spoelvlloeistof	3,32	8,62

#### Voorbeeld 4. Transport van fytosphingosine in een gefisteld varken

Om in een *in vivo* systeem te onderzoeken of sphingolipiden uit de  
5 voeding ook daadwerkelijk in de dikke darm kunnen aankomen en niet  
voortijdig worden opgenomen of gemetaboliseerd, werd aan een gefisteld  
varken varkensbasisvoer gevoederd waaraan fytosphingosine (1 gew.%) was  
toegevoegd.

Het voer werd bereid door een oplossing van fytosphingosine in  
10 ethanol met het voer te mengen en *in vacuo* te drogen. De darminhoud  
(chymus) aan het einde van de dunne darm werd ieder uur apart  
opgevangen en drooggevroren. De droge darminhoud werd vervolgens met  
chloroform/methanol (2:1, v/v) geëxtraheerd. De extracten werden over  
glaswol gefiltreerd en ingedampt onder een stikstofstroom. De residuen  
15 werden met behulp van LC-MS op de aanwezigheid van fytosphingosine,  
sphingosine, sphinganine en sphingomyeline gecontroleerd.



In Figuur 2 staan de hoeveelheden van de in de darminhoud aanwezige sphingolipiden vermeld in microgram per gram drooggewicht van het monster.

Er was geen sphingosine aantoonbaar in de darminhoud.

- 5 Fytosphingosine komt vanaf 2 uur na het voederen uit de dunne darm met een maximum van 76 µg/g droge darminhoud na 9 uur.

Het is opvallend dat er naast fytosphingosine ook kleine hoeveelheden sphinganine en grotere hoeveelheden sphingomyeline in de darminhoud aan het einde van de dunne darm aanwezig zijn. Deze laatste 2  
10 sphingolipiden zijn waarschijnlijk reeds van nature in de voeding aanwezig.

#### Voorbeeld 5. Antimicrobiële werking van fytosphingosine in TIM-2

*Clostridium difficile* komt bij mens en dier vaak in de dikke darm voor en veroorzaakt diarree. Aan een standaard TIM-2 voeding werd een  
15 mengsel van de volgende bacteriën toegevoegd: *Bifidobacterium* (Log kiemgetal 8,8), *Bacteriodes* (Log kiemgetal 9,7), Sulfiet reducerende *clostridia* (Log kiemgetal 6,6), *Enterococcus* (Log kiemgetal 8,7), *Lactobacillus* (Log kiemgetal 8,5) en *Enterobacteriaceae* (Log kiemgetal 6,6) (Zie startwaarden figuur 3).

20 Op tijdstip  $t=0$  werd *Clostridium difficile* tot hoeveelheid van ongeveer 5,75 log k.v.e./mL toegevoegd. Na mengen werd fytosphingosine in twee concentraties (10 en 50 µg/mL) in het TIM-2 systeem gebracht. Op tijdstippen 0, 12 en 24 uur werden monsters genomen die verdund werden en werden uitgeplaat op voor elke bacterie selectieve agarplaten (zie boven  
25 voor de selectieve platen). Het aantal kolonies van elke bacteriestam werd als maat voor de bacterieconcentratie in TIM-2 genomen. Bij 10 µg/mL fytosphingosine vond geen significante afdoding van *C. difficile* of van andere bacteriën plaats. Bij 50 µg/mL is binnen 12 uur een snelle en selectieve 550-voudige afname van *C. difficile* te zien. De andere bacteriën  
30 nemen veel minder af in aantal. *Bifidobacterium* neemt af met een factor 55,

*Bacteriodes* met een factor 10, Sulfiet reducerende *Clostridium* met een factor 36, *Enterococcus* met een factor 5, *Lactobacillus* met een factor 24 en de *Enterobacteriaceae* nemen af met een factor 77. In Figuur 3 staan de logaritmische kiemgetallen als functie van de blootstellingstijd vermeld.

- 5 Kiemgetallen lager dan 3 log k.v.e./mL worden in de praktijk bijna altijd als 0 aangemerkt omdat dergelijke lage kiemgetallen niet goed meer zijn te bepalen.

#### Conclusie van de experimenten

- 10            Uit de resultaten van de hierboven beschreven proefnemingen blijkt dat fytosphingosine, sphinganine, sphingosine en lyso-sphingomyeline op agarplaten een sterke antimicrobiële werking tegen Gram-positieve bacteriën hebben. Fytosphingosine en sphinganine hebben in vloeibare culturen ook een sterke antimicrobiële werking. In het TIM-2 dikke darm
- 15 model heeft fytosphingosine een selectieve antimicrobiële werking tegen het diarree veroorzakende *Clostridium difficile*. Zowel sphinganine als fytosphingosine worden in het maag/dunnedarmmodel TIM-1 in voldoende mate naar de dikke darm getransporteerd om daar hun antimicrobiële werking te kunnen vertonen. Ook in een varken werd er voldoende
- 20 fytosphingosine afkomstig uit de voeding aan het einde van de dunne darm uitgescheiden om in de dikke darm het gewenste effect te kunnen hebben.

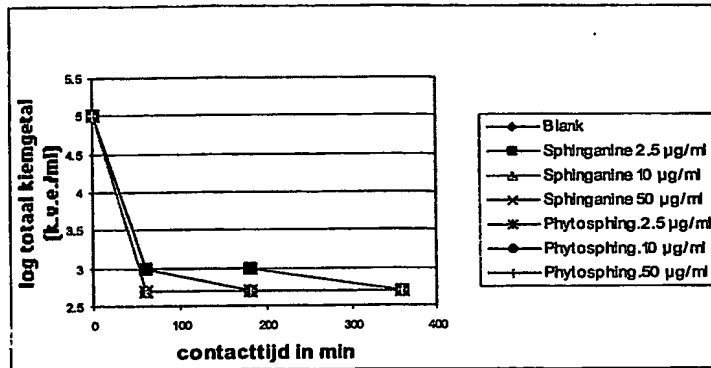
## CONCLUSIES

1. Werkwijze voor het verbeteren van de samenstelling van de darmflora van een vogel of een zoogdier, omvattende het toedienen aan genoemde vogel of genoemd zoogdier van een voedingsmiddel waarin één of meer sphingolipiden gekozen uit de groep bestaande uit fytosphingosine, sphingosine, lyso-sphingomyeline en sphinganine, of een precursor, een derivaat, of geschikt zout daarvan, overaanwezig zijn.
2. Werkwijze volgens conclusie 1, waarin genoemde één of meer sphingolipiden in genoemd voedingsmiddel aanwezig is in een hoeveelheid van 0,05 tot 50 gew.%.  
5
3. Werkwijze volgens conclusie 1, waarin genoemd sphingolipide in genoemd voedingsmiddel aanwezig is in een hoeveelheid van 1 tot 10 gew.%.  
10
4. Werkwijze voor het verbeteren van de samenstelling van de darmflora van een vogel of een zoogdier, omvattende het toedienen aan genoemde vogel of genoemd zoogdier van een farmaceutisch preparaat omvattende een sphingolipide gekozen uit de groep bestaande uit fytosphingosine, sphingosine, lyso-sphingomyeline en sphinganine, of een precursor, een derivaat, of geschikt zout daarvan en één of meer excipiëntia.  
15
5. Werkwijze volgens één van de conclusies 1-4, waarin genoemd sphingolipide fytosphingosine is.
6. Voedingsmiddel waarin één of meer sphingolipiden gekozen uit de groep bestaande uit fytosphingosine, sphingosine, lyso-sphingomyeline en sphinganine, of een precursor, een derivaat, of geschikt zout daarvan, overaanwezig zijn.  
20
7. Voedingsmiddel volgens conclusie 6, waarin genoemde één of meer sphingolipiden aanwezig zijn in een hoeveelheid van 0,05 tot 50 gew.%.  
25
8. Voedingsmiddel volgens conclusie 6 of 7, waarin genoemd sphingolipide fytosphingosine is.

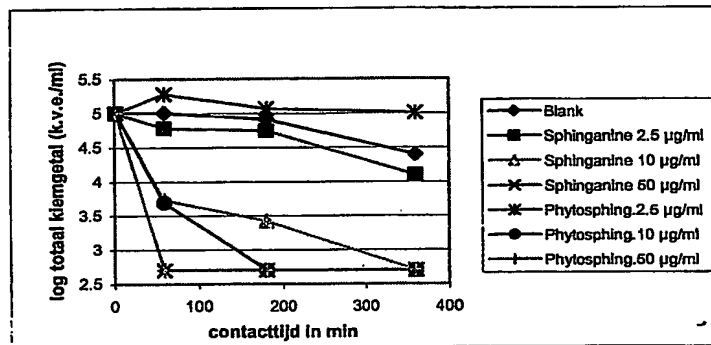
9. Diervoeder omvattende een voedingsmiddel volgens één van de conclusies 6-8.
10. Toepassing van een sphingolipide gekozen uit de groep bestaande uit fytosphingosine, sphingosine, lyso-sphingomyeline en sphinganine, voor de bereiding van een geneesmiddel ter verbetering van de samenstelling van de darmflora.
11. Toepassing volgens conclusie 10, waarin genoemd sphingolipide fytosphingosine is.
12. Werkwijze voor de bereiding van een voedingsmiddel volgens één van de conclusies 6-8, omvattende het verwerken van genoemd sphingolipide, of een derivaat, of geschikt zout daarvan, in een voedingsmiddel in een gehalte van 0,05 tot 50 gew.%.

1022443

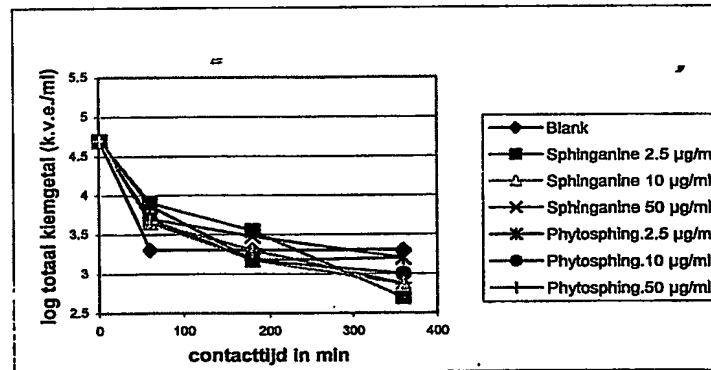
A



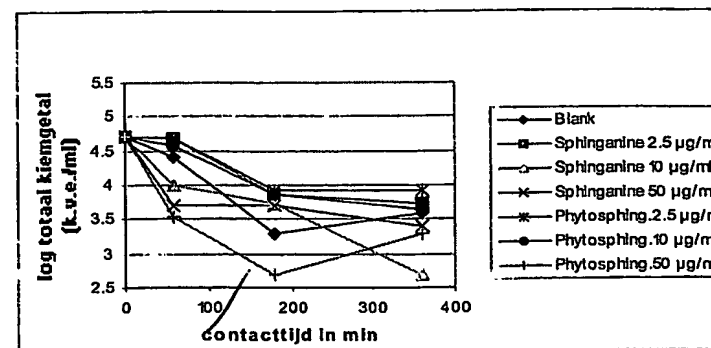
B



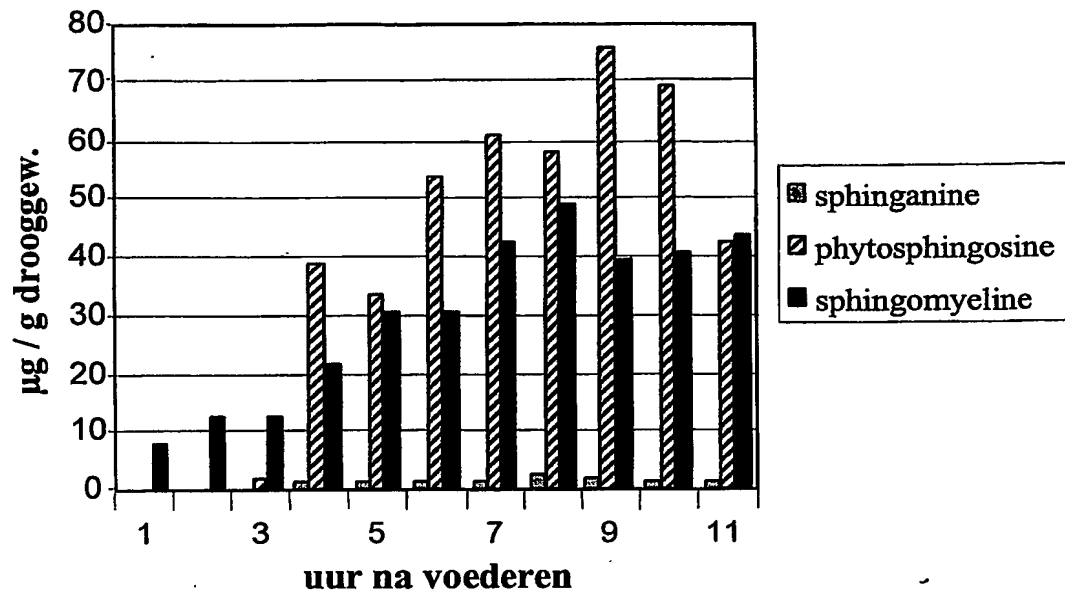
C



D

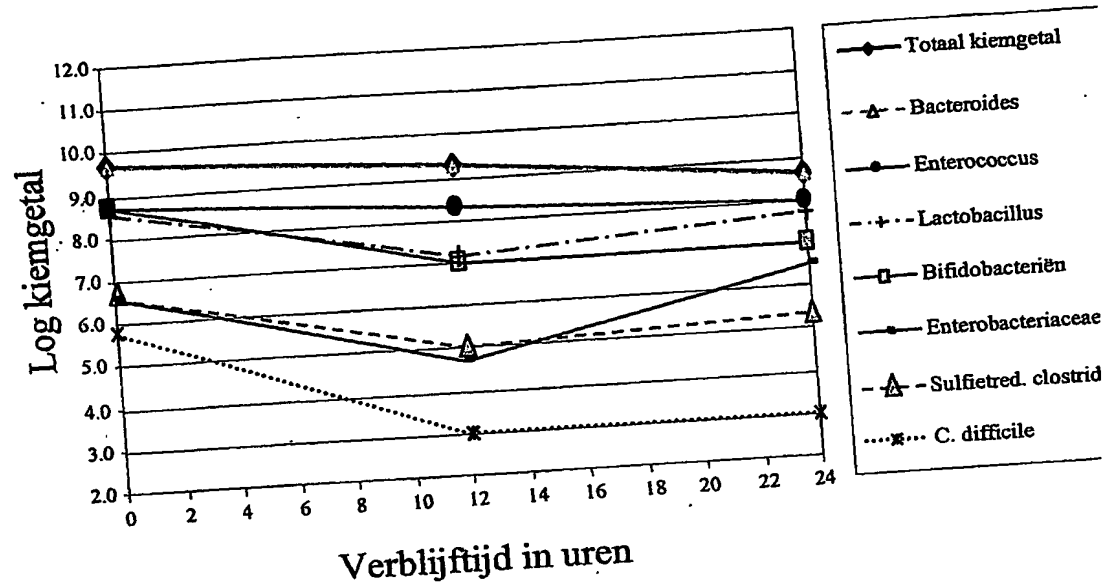


Figuur 1



Figuur 2

1022443



Figuur 3